

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 19820100154004

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

内质网与线粒体微域耦合的钙震荡
和 IP_3Rs 通道集团的局域钙动力学

Microdomain Crosstalk between Endoplasmic Reticulum
and Mitochondria for Ca^{2+} Oscillations & Local Ca^{2+}
Dynamics for IP_3Rs Cluster

祁 宏

指导教师姓名: 帅建伟 教授

专 业 名 称: 理论物理

论文提交日期: 2014 年 8 月

论文答辩时间: 2014 年 9 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2014 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☐ 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 生物学背景	1
1 生死攸关的钙离子	1
2 钙信号系统	1
3 内质网和线粒体是重要的钙库	3
4 内质网释放钙信号的多尺度行为	4
4.1 内质网钙信号研究简介	4
4.2 IP_3 受体通道	5
4.3 钙信号的层级事件	8
4.4 SH-SY5Y 细胞中的局域钙信号	9
5 线粒体钙信号研究的主要进展	11
5.1 早期线粒体钙信号的研究	11
5.2 钙微域假说的提出与验证	11
5.3 MCU 及其调控蛋白	13
5.4 线粒体对细胞质 Ca^{2+} 的影响	14
5.5 内质网与线粒体之间的距离	16
6 本章小结	17
第二章 前人已发表模型和本文研究内容	18
1 构建数学模型基础	18
1.1 质量作用定律	18
1.2 米曼方程和希尔函数	19
1.3 马尔科夫过程	21
2 已发表的内质网钙模型	22
2.1 DeYoung-Keizer 模型及其简化版 Li-Rinzel 模型	22
2.2 双钙池及单钙池模型	27
3 已发表的内质网-线粒体互作模型	28
3.1 Fall-Keizer 模型	29
3.2 Marhl 模型及其扩展模型 Szopa 模型	31
4 已发表的局域钙模型	32
4.1 Rüdiger-Shuai 模型	32
4.2 其他关于 SH-SY5Y 细胞 puff 的模型	34
5 本论文的主要研究内容	35
6 本章小结	36
第三章 内质网与线粒体最优微域耦合的钙震荡	37
1 引言	37
2 模型	39
3 结果	47
3.1 钙震荡	47
3.2 线粒体做为储存 Ca^{2+} 的钙库	48

3.3 $\text{IP}_3\text{R-MCU}$ 距离调节钙震荡	50
3.4 临界 $\text{IP}_3\text{R-MCU}$ 距离	51
3.5 $\text{IP}_3\text{R-MCU}$ 距离对钙动力学的影响	52
3.6 IP_3 浓度对钙动力学的影响	54
3.7 变化的 IP_3Rs 通道数目检验模型的鲁棒性	56
4 讨论	58
4.1 临界 $\text{IP}_3\text{R-MCU}$ 距离是钙信号的决定性因素	58
4.2 线粒体对胞质钙信号的调节因 $\text{IP}_3\text{R-MCU}$ 距离而异	59
4.3 内质网与线粒体之间的距离	60
4.4 线粒体内外膜间距是细胞的一种保护机制	61
4.5 模型及方法的讨论	61
5 本章小结	62
第四章 IP_3Rs 钙离子通道集团中的局域钙动力学	64
1 引言	64
2 模型	65
3 结果	68
3.1 局域钙信号 blip 和 puff	68
3.2 IP_3Rs 通道集团大小对 blip 和 puff 的影响	71
3.3 IP_3 浓度对 blip 和 puff 的影响	74
3.4 细胞质静息钙浓度对 blip 和 puff 的影响	76
3.5 突增式 IP_3 浓度与响应延迟时间	78
3.6 饱和 IP_3 浓度下对 puff 事件的解析	81
4 讨论	84
4.1 通道关闭的自抑制机制	84
4.2 决定 blip 持续时间的不同动力学	84
4.3 IP_3 浓度和静息钙浓度对局域事件的不同影响	85
4.4 IP_3Rs 通道集团规模对 puff 频率和响应延迟时间的影响	85
4.5 Blip 在增加静息钙浓度和引发钙波中所起的作用	86
5 本章小结	86
第五章 总结与展望	88
参考文献	91
攻读博士学位期间完成的论文	101
致谢	102

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Biological Background.....	1
1 Ca^{2+} : A Matter of Life or Death.....	1
2 Ca^{2+} Signalling Systems	1
3 ER and Mitochondria are Important Ca^{2+} Store.....	3
4 Multi-scale Behaviors of ER Ca^{2+} Signalling	4
4.1 Brief Introduction of ER Ca^{2+} Signalling	4
4.2 IP_3R Ca^{2+} Channel.....	5
4.3 Hierarchical Organization of Ca^{2+} Signals.....	8
4.4 Local Ca^{2+} Signals in SH-SY5Y Cell	9
5 The Advancement of Mitochondrial Ca^{2+}	11
5.1 Early Research of Mitochondrial Ca^{2+}	11
5.2 The Propoasl and Verification of Ca^{2+} Microdomain	11
5.3 MCU and Its Regulator	13
5.4 The Effect of Mitochondria on Cytosolic Ca^{2+}	14
5.5 The Distance between ER and Mitochondria	16
6 Summary.....	17
Chapter 2 Published Model and the Main Contents of this Article	18
1 Basic Knowledge of Mathematical Model.....	18
1.1 The Low of Mass Action.....	18
1.2 Michaelis-Menten Equation and Hill Function.....	19
1.3 Markov Processes.....	21
2 Published Model about ER Ca^{2+} Signalling	22
2.1 DeYoung-Keizer Model and Simplified Li-Rinzel Model	22
2.2 Two-pool Model and One-pool Model	27
3 Published Model of ER-Mitochondria Crosscoupled Ca^{2+} Signalling	28
3.1 Fall-Keizer Model	29
3.2 Marhl Model and Extended Szopa Model	31
4 Published Model about Local Ca^{2+} Signalling.....	32
4.1 Rüdiger-Shuai Model.....	32
4.2 Other Puff Models about SH-SY5Y cell	34
5 Main Contents of this Article	35
6 Summary.....	36
Chapter 3 Microdomain Crosstalk between ER and Mitochondria for Ca^{2+} Oscillations..	37
1 Introduction	37
2 Model	39
3 Results	47
3.1 Ca^{2+} Oscillations	47
3.2 Mitochondria Serve as Ca^{2+} Reservoirs.....	48

3.3 Ca^{2+} Oscillations Regulated by IP_3R -MCU Distance	50
3.4 The Critical IP_3R -MCU Distance	51
3.5 Ca^{2+} Dynamics Modulated by IP_3R -MCU Distance	52
3.6 Ca^{2+} Dynamics Modulated by $[\text{IP}_3]$	54
3.7 Robustness with Varying Clustered IP_3R Number	56
4 Discussion	58
4.1 The Critical IP_3R -MCU Distance is Crucial for Ca^{2+} Signalling	58
4.2 Mitochondrial Modulation on IP_3R Dynamics Depend on IP_3R -MCU	59
4.3 The Distance between ER and Mitochondria	60
4.4 Intermembrane Space is a Defense Mechanism	61
4.5 About the Model and Methods	61
5 Summary	62
Chapter 4 Local Ca^{2+} Dynamics for IP_3Rs Channel Clusters	64
1 Introduction	64
2 Model	65
3 Results	68
3.1 Local Calcium Puffs and Blips	68
3.2 Effects of Cluster Size on Blips and Puffs	71
3.3 Effects of $[\text{IP}_3]$ on Blips and Puffs	74
3.4 Effects of Basal $[\text{Ca}^{2+}]$ on Blips and Puffs	76
3.5 Mean Latency Responding to Step IP_3	78
3.6 Analytical Discussion of Puff Events at Saturating $[\text{IP}_3]$	81
4 Discussion	84
4.1 Self-inhibition Mechanism for Channel Closure	84
4.2 Different Dynamics to Determine the Blip Duration	84
4.3 Different Effects of IP_3 and Basal $[\text{Ca}^{2+}]$ on Local Releases	85
4.4 Cluster Size Modified IPI and the First Puff Latency	85
4.5 The Possible Role of Blips to Enhance Basal $[\text{Ca}^{2+}]$ and Initiate Ca^{2+} Waves	86
5 Summary	86
Chapter 5 Conclusions and Outlook	88
References	91
List of Publications	101
Acknowledgements	102

摘要

钙离子(Ca^{2+})是细胞内广泛存在的一种重要的第二信使,参与并控制着几乎所有的生命活动过程。大部分真核细胞中细胞质 Ca^{2+} 浓度($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$)复杂的时空动力学都依赖于内质网和线粒体这两种主要的细胞器。

在现代线粒体生理学中,钙微域在线粒体摄钙过程中所起的关键作用已被大家广泛认可。目前为止大部分已发表的 Ca^{2+} 模型仅考虑内质网的作用,只有少数模型包含了线粒体,但是它们或不太符合实际情况或没有考虑钙微域。在第一个工作中,我们基于三磷酸肌醇分子受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, IP_3Rs)通道和线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)之间形成的钙微域构建了一个内质网与线粒体互作的 Ca^{2+} 模型。我们的模型指出在 IP_3Rs 通道与 MCU 之间存在一个临界距离 r_{crt} ,在此距离下内质网释放 Ca^{2+} 总量中大约有一半被线粒体吸收,而且线粒体对细胞质钙信号的调节在此距离附近发生显著变化。当二者的距离大于 r_{crt} 时,线粒体摄钙通过降低 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 的振幅来减缓高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 对 IP_3Rs 通道的抑制作用,从而对 Ca^{2+} 释放提供正调节。当二者的距离小于 r_{crt} 时,强力的线粒体摄钙迫使 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 保持在很低的水平,防止细胞质 Ca^{2+} 对 IP_3Rs 通道的激活,从而对 Ca^{2+} 释放提供负调节。我们的模型预测当 MCU 与 IP_3Rs 通道距离太近时,增强的线粒体摄钙会使得 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 大幅上涨。我们的模型显示在健康的细胞中为了进行有效的 Ca^{2+} 转运和产生有生理意义的钙信号, IP_3R -MCU 的最优距离为 30-85 nm。我们揭示线粒体内外膜的间距为防止高 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 的发生提供了一种保护机制,并暗示当 IP_3Rs 通道与 MCU 不在它们的最优距离工作时产生的异常高的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 可能是一种病理机制。

除了作为整体钙信号钙波的基本构建之外,局域钙信号(blip 和 puff)还直接控制着一些细胞生理活动,因此受到实验和理论学家的关注。然而人们对多 IP_3Rs 通道集团中 blip 的行为,以及 blip 的生物学功能了解的很少。在第二个工作中,我们模拟了小规模 IP_3Rs 通道集团中局域钙信号的释放,主要研究了一个随机打开的 IP_3Rs 通道或触发其它通道打开形成 puff 或仅仅作作为 blip 发生的概率以及它们的频率。我们的结果显示相邻局域事件的间隔期以及第一次释放

事件的响应延迟时间与 IP_3Rs 通道数目的倒数($1/N$)呈线性关系, 而相邻 puff 事件的间隔期以及第一次 puff 事件的响应延迟时间与 $1/N$ 为非线性关系。此外, 模拟结果还显示 blip 在所有局域事件中发生的比例以及它的频率都会随着静息 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 的增加而增大, 从而使得 blip 对静息 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 的增加有持续的贡献。因此, 我们的结果暗示 blip 不仅仅只是未触发 puff 的局部事件, 它可能可以通过增加静息 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ 来促进钙波的发生, 在仅含有数个 IP_3Rs 通道集团的小细胞内发挥重要作用。

关键词: 钙信号, 内质网, 线粒体, IP_3Rs 通道, 线粒体钙单向转运体, 钙微域, Blip, Puff

Abstract

The calcium ion (Ca^{2+}) acts as a ubiquitous cellular messenger capable of regulating a wide variety of cellular processes. The complex spatial-temporal profiles of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$) relies mainly on Endoplasmic Reticulum (ER) and mitochondria in most of the eukaryotic cells.

The critical role of Ca^{2+} microdomains in mitochondrial Ca^{2+} uptake is now well established in mitochondrial physiology. Most of the published mathematical models only focus on the ER, and a few models include mitochondria, but they are unrealistic or do not take the indispensable Ca^{2+} microdomains theory into account. In the first work, a Ca^{2+} signaling model is proposed to consider the crosstalk of Ca^{2+} ions between the ER and mitochondria within microdomains around inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs) and the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU). Our model indicates that there is a critical IP_3R -MCU distance at which 50% of the ER-released Ca^{2+} is taken up by mitochondria and that mitochondria modulate Ca^{2+} signals differently when outside of this critical distance. When IP_3R -MCU distance is larger than the critical distance mitochondrial Ca^{2+} uptake offers a positive modulation of Ca^{2+} release by reducing $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ amplitude to suppress the inhibition dynamics of high $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ on IP_3Rs . However, when the IP_3R -MCU distance is less than the critical distance, strong mitochondrial uptake forces $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ at a small value to prevent the activation dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ on IP_3Rs , offering a negative modulation on Ca^{2+} release. Our model predicts that when MCU are too closely associated with IP_3Rs , the enhanced mitochondrial Ca^{2+} uptake will produce an increase of cytosolic Ca^{2+} spike amplitude. Notably, the model demonstrates the existence of an optimal IP_3R -MCU distance (30-85 nm) for effective Ca^{2+} transfer and the successful generation of Ca^{2+} -signals in healthy cells. We suggest that the space between the inner and outer mitochondria membranes provides a defense mechanism against occurrences of high $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$. Our results also hint at a possible pathological mechanism in which abnormally high $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cyt}}$ arises when the IP_3R -MCU distance is in excess of the optimal range.

Serving as a building block for Ca^{2+} waves at the global level and regulating directly specific physiological functions, the local Ca^{2+} signals have attracted great

experimental and theoretical interest. However, little is known on the blip behavior for a cluster with several IP_3Rs , and especially the possible biological roles of blips. In the second work, we model the local calcium release from small clusters with only several IP_3R channels, focusing on the prevalence and frequencies of the stochastic opening of one channel either to trigger other channels to open (as a puff) or to fail to cause any channel to open (as a blip). We show that there are linear relations for the inter-event interval (including blips and puffs) and the first release event latency against the inverse cluster size. However, nonlinearity is found for inter-puff interval and the first puff latency against the inverse cluster size. Furthermore, the simulations indicate that the blip fraction among all release events and the blip frequency keep increasing with increasing basal $[Ca^{2+}]$, giving an increasing contribution of blips to basal $[Ca^{2+}]$. This result suggests that blips are not just failures to trigger puffs, but they may also show a possible biological function to contribute to the initiation of calcium waves by a preceding increase of basal $[Ca^{2+}]$ in cells typically with small IP_3Rs clusters.

Key Words: Ca^{2+} signaling, Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, IP_3Rs , MCU, Ca^{2+} microdomains, Blip, Puff

第一章 生物学背景

1 生死攸关的钙离子

人体内含有大约 1,400 克钙，其中大部分存储在骨骼和牙齿中，只有不到 10 克的钙循环于血液和细胞外液中，这极少部分游离的钙可以进入细胞中发挥极其重要的作用^[1]。这是因为钙离子(Ca^{2+})是细胞内广泛存在的一种重要的信号分子。在生命之初它调控受精以及细胞分化的过程，随后参与并控制基因表达、新陈代谢、分泌、肌肉收缩，以及学习记忆等几乎所有的生命活动过程(见图 1.1)^[2, 3]。同时， Ca^{2+} 参与包括细胞坏死、细胞凋亡以及细胞自噬等各种形式的细胞死亡^[4, 5]。因此，可以说 Ca^{2+} 是细胞内生死攸关的信使。

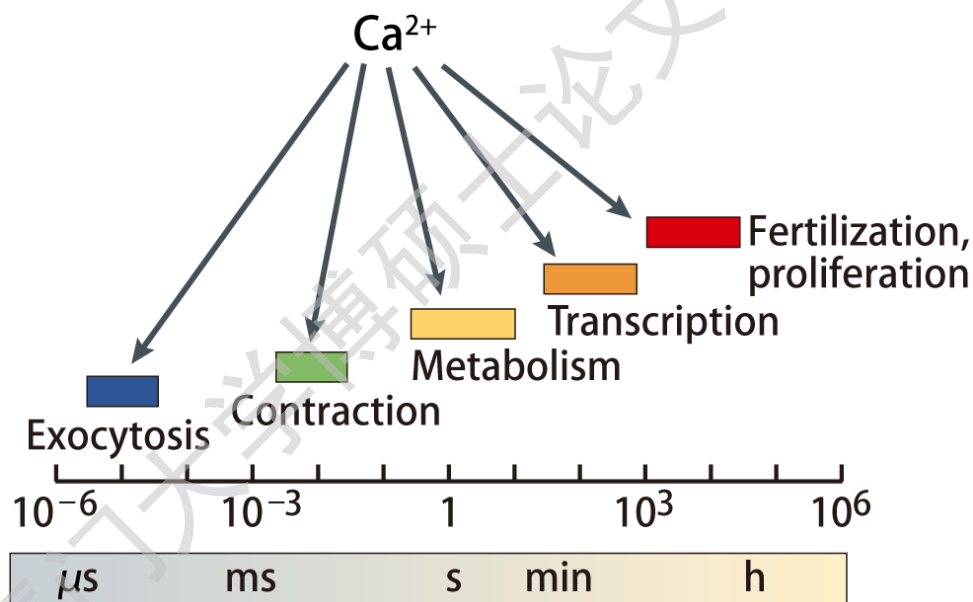


图 1.1 Ca^{2+} 控制几乎所有的生命活动过程。 Ca^{2+} 通过钙瞬变或钙震荡控制诸多不同时间尺度上发生的生理过程。图片引自文献^[2]。

2 钙信号系统

钙信号作用的基本机制既有简单的一面又有复杂的一面。其简单性体现在仅依靠细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) 的提升便可控制细胞活动。细胞处于静息状态时，胞质内的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 在 20-100 nM 范围之内^[6]；而当细胞受到刺激时， $[\text{Ca}^{2+}]$ 迅速升高，执行所需的生理功能。钙信号可调控多种细胞活动又体现了其复杂

性。这种复杂性来源于细胞是一个由多种 Ca^{2+} 通道、 Ca^{2+} 泵、 Ca^{2+} 转运体、 Ca^{2+} 交换体和 Ca^{2+} 结合蛋白^[2]组成的精密系统(见图 1. 2)，这些成分控制着 Ca^{2+} 的流动过程，它们之间的不同组合便产生了拥有各种不同时空动力学特性的钙信号。

在时间域方面，钙信号的动力学特性体现在 $[\text{Ca}^{2+}]$ 以钙瞬变(transient)或钙震荡(oscillation)的形式变化。每次瞬变或震荡的上升相是由引起细胞质 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高的“开反应”所决定的，而其下降相主要由导致细胞质 $[\text{Ca}^{2+}]$ 降低的“关反应”所决定^[2]。在“开反应”中，细胞外的 Ca^{2+} 可经位于细胞膜上的门控通道进入细胞质中，这些门控通道包括：电压门控通道(voltage-operated channel, VOC)，钙库

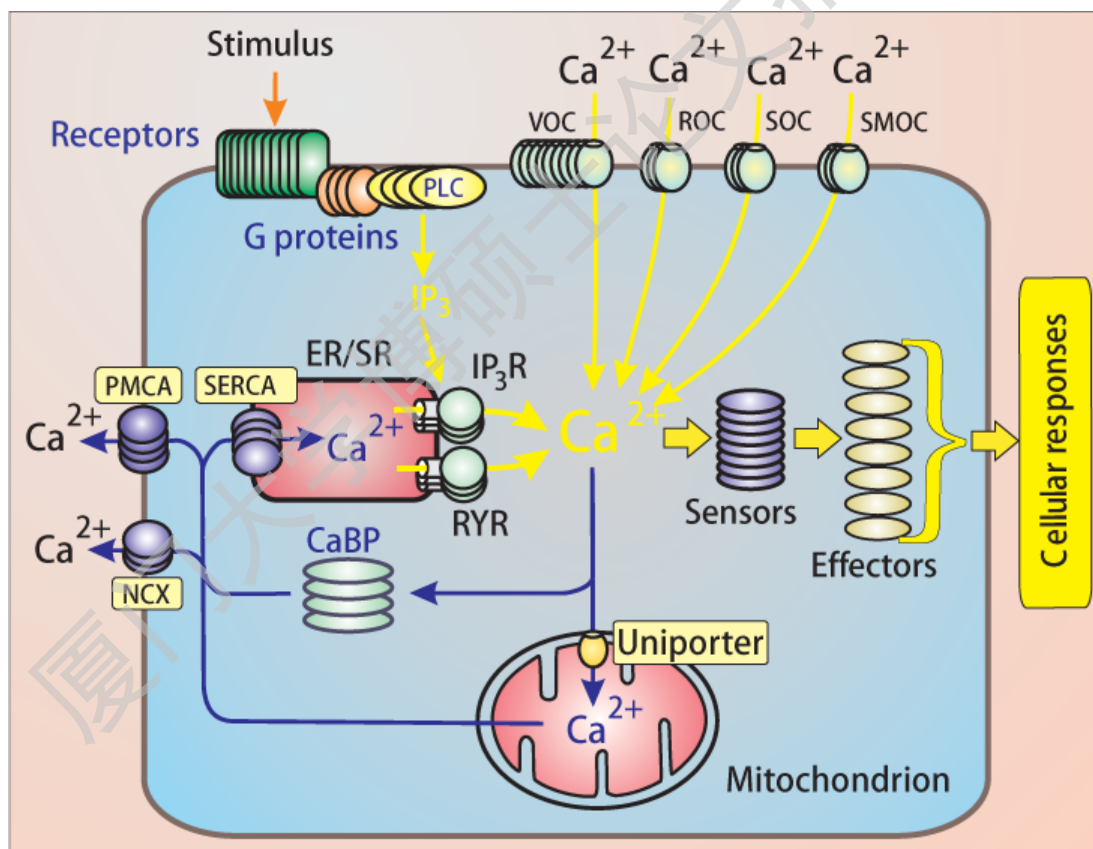


图 1. 2 钙信号系统的主要成分。黄色和蓝色箭头分别表示 Ca^{2+} 进入和离开细胞质的途径。 Ca^{2+} 可由细胞膜上的 4 种通道和内质网(ER/SR)上的两种 Ca^{2+} 释放通道进入细胞质中，随后 Ca^{2+} 可被钙泵泵出细胞外或重新返回到内质网中。在这期间， Ca^{2+} 还可以进入线粒体(mitochondrion)，或是与 Ca^{2+} 结合蛋白(CaBP)短暂结合。为了执行其生理功能， Ca^{2+} 可与其感受蛋白(sensors)高度特异性结

合，从而传递信号给下游的效应蛋白(effectors)，最终引发相应的细胞响应。
IP₃R, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor; **NCX**, Na⁺/Ca²⁺ exchanger; **PMCA**, plasma membrane Ca²⁺-ATPase; **ROC**, receptor-operated channel; **RYR**, ryanodine receptor; **SERCA**, sarco/endo-plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; **SMOC**, second messenger-operated channel; **SOC**, store-operated channel; **VOC**, voltage-operated channel。图片来源于 Michale Berridge, www.cellsignallingbiology.org。

门控通道(store-operated channel, SOC)，受体门控通道(receptor-operated channel, ROC)和第二信使门控通道(second messenger-operated channel, SMOC)；同时，内质网中的 Ca²⁺还可由位于内质网膜上的三磷酸肌醇分子受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP₃R)和雷诺定受体(ryanodine receptor, RYR) Ca²⁺释放通道流入细胞质中。在“关反应”中，细胞质中的 Ca²⁺可由位于细胞膜上的 Ca²⁺泵(plasma membrane Ca²⁺-ATPase, PMCA)泵出到细胞外或由位于内质网膜上的 Ca²⁺泵(sarco/endo-plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, SERCA)重新泵回到内质网中。在此期间，Ca²⁺还可经位于线粒体膜上的 Ca²⁺单向转运体(uniporter)进入到线粒体中或是与 Ca²⁺结合蛋白短暂结合。此外，位于细胞膜上的 Na⁺-Ca²⁺交换体(Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCX)可使细胞内的 Ca²⁺流出细胞外，而位于线粒体膜上的 NCX 可使流入线粒体中的 Ca²⁺进入细胞质中。

3 内质网和线粒体是重要的钙库

内质网和线粒体做为细胞内重要的细胞器，在钙信号中起着极其重要的作用，这是因为钙信号系统中的很多成分都位于这两个细胞器上。当细胞处于静息状态时，细胞内的大部分 Ca²⁺储藏于内质网中，其浓度为 100-900 μM^[7]甚至更高^[8]；当细胞受到刺激需要执行生理功能时，大量 Ca²⁺可从内质网中释放出来，从而使胞质内的[Ca²⁺]迅速升高。从内质网释放的 Ca²⁺，一部分会暂时地进入线粒体，随后又排出到细胞质中，最终重新回到内质网之中。因此，内质网可以被看做是一个永久储存 Ca²⁺的钙库，而线粒体则是一个临时储存 Ca²⁺的钙库。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库